

**VERFAHREN ZUR KOVALENTEN BINDUNG VON BIOLOGISCH AKTIVEN
VERBINDUNGEN AN SUBSTITUIERTE POLYOXYALKYLENGLYKOLE UND IHRE
MONOALKOXYDERIVATE**

Publication number: DD287950
Publication date: 1991-03-14
Inventor: KUEHN MANFRED (DE)
Applicant: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DE)
Classification:
- international: **C12N11/08; C12N11/00;** (IPC1-7): C12N11/08
- european:
Application number: DD19890332719 19890915
Priority number(s): DD19890332719 19890915

Report a data error here

Abstract not available for DD287950

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

PATENTSCHRIFT

(11) **DD 287 950 A5**

5(51) C 12 N 11/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 332 719 2	(22)	15.09.89	(44)	14.03.91
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DE				
(73)	Zentralinstitut für Molekularbiologie, AG Patent- und Neuererwesen, Robert-Rössle-Straße 10, O - 1115 Berlin-Buch, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate				

(55) Verfahren; kovalente Bindung; Polyoxyalkylenglykole; biologisch aktive Verbindungen; bifunktionelle Aktivierungsmittel

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate mit primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltenden, funktionellen Gruppen werden in einem ersten Reaktionsschritt mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln in aktivierte Polymere überführt. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgt die kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen, zum Beispiel von biokatalytisch aktiven oder inaktiven Proteinen und höher integrierten Systemen wie Mikroorganismen an die aktivierten Polymeren. Die Umsetzungen erfolgen in wässrigen Lösungen, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen oder, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels. Die modifizierten, biologisch aktiven Verbindungen werden in der Biotechnologie und Medizin eingesetzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate, dadurch gekennzeichnet, daß biologisch aktive Verbindungen an Thiolgruppen, primäre Aminogruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Polymertyp der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, die in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2 bis 12 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Lösungsmittelgemischen aus organischen Lösungsmitteln oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart eines säurebindenden Mittels oder einer Puffersubstanz, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln aktiviert werden, in wäßrigen Lösungen, gegebenenfalls gepuffert oder in organischen Lösungsmitteln, gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel oder Gemischen aus wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln, die gegebenenfalls gepuffert oder mit säurebindenden Mitteln versetzt sind oder Gemischen organischer Lösungsmittel, gegebenenfalls ebenfalls in Gegenwart von säurebindenden Mitteln, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C kovalent gebunden werden und die Isolierung und Reinigung nach an sich bekannten Verfahren erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als biologisch aktive Verbindungen Biokatalysatoren wie Enzyme, Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme und Koenzyme oder biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine, zuckerbindende Proteine oder in vitro hergestellte Konjugate aus Biokatalysatoren und biokatalytisch inaktiven Proteinen oder nieder- und hochmolekulare Effektoren wie Nukleinsäuren, Bruchstücke von Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka, Sauerstoff bindende, aktivierende und transportierende, synthetische Verbindungen sowie Affinitätsliganden eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel Dialdehyde, diazierte, aromatische Diamine, Diisocyanate, Diisobiocyanate, gleichzeitig Diisocyanat- und Diisothiocyannatgruppen enthaltende Verbindungen, bisaktivierte Derivate von Dikarbonsäuren wie Säurechloride, Säureazide und aktivierte Ester, Diepoxide, Chinone, Epihalogenhydrine, Karbodilimide, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine oder 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivierungsreaktionen in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C ausgeführt werden, bei Säuren freisetzenden Aktivierungsreaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden erfolgt.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß die kovalente Bindung von Biokatalysatoren, vorzugsweise von Enzymen, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, bei 0°C bis 100°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, 4, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß als säurebindende Mittel tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate oder Alkalisalze kondensierter Aromaten und Heteroaromaten eingesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Biokatalysatoren Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven Verbindungen an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate. Das Verfahren und die danach hergestellten Verbindungen können in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin angewendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Makromolekulare Verbindungen mit Aminogruppen werden sehr oft und solche mit Thiol-, Amidoxim-, Hydroxamsäure- oder Karbonsäurehydrazidgruppen weniger zur Immobilisierung biologisch aktiver Verbindungen verwendet (Methods Enzymol. 1988, 137, [Immobilized Enzymes and Cells], Pt. A-D, Ed. by K. Mosbach). In dieser Form können die mit den genannten, funktionellen Gruppen versehenen Makromoleküle bei Immobilisierungsreaktionen allerdings nur eingesetzt werden, wenn reaktive, hochaktivierte Gruppen besitzende, biologisch aktive Verbindungen an die Makromoleküle kovalent gebunden werden sollen. In der Regel werden bei Immobilisierungsreaktionen aber die makromolekularen Verbindungen mit den genannten, funktionellen Gruppen vor der kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen aktiviert, was praktisch bedeutet, daß die funktionellen Gruppen der Makromoleküle in einen solchen reaktiven Zustand überführt werden müssen, daß eine Verdünnungsreaktion beider Komponenten erfolgen kann.

In Amino-, Thiol-, Amidoxim-, Karbonsäurehydrazid- und Hydroxamsäuregruppen-In letzteren Verbindungen kann als tautomere Form ebenfalls die Oximgruppe $=NOH$ vorliegen – enthaltenden Verbindungen besitzen die funktionellen Gruppen nukleophile Eigenschaften, so daß die nukleophilen Substitutionsreaktionen und auch verschiedenartigsten Additionsreaktionen zugänglich sind. Diese Reaktionstypen gehören zu den grundlegenden Reaktionen der Synthesechemie, und auf diese Weise können durch eine Vielzahl von Verknüpfungsreaktionen von zwei oder mehreren bekannten Verbindungen neue Verbindungen synthetisiert werden. Diese Reaktionsprinzipien werden auch zur Aktivierung der zur Immobilisierung von biologisch aktiven Verbindungen geeigneten, unlöslichen Makromoleküle wie Zellulose, Sepharosen, Sephadex oder Polyhydroxyethylmethakrylate angewendet. Mit Vorteil werden in diesen Fällen sehr oft bi- beziehungsweise multifunktionelle, niedermolekulare Aktivierungsmittel verwendet, weil auf diese Weise schon nach einem Reaktionsschritt das Makromolekül in aktivierter Form vorliegt. Unter den bi- oder multifunktionellen und zur Aktivierung von Makromolekülen geeigneten Aktivierungsmitteln sind eine Vielzahl leicht zugänglicher, chemischer Reagentien, die für eine Aktivierung in Frage kommen. Einige wichtige sind zum Beispiel Dialdehyde, aktivierte Dikarbonsäurederivate, aliphatische, durch Aktivierung reaktiv gemachte aromatische und heteroaromatische Dihalogenide beziehungsweise höher halogenierte Verbindungen und funktionalisierte und gleichzeitig reaktiv gemachte Diaminoverbindungen.

In wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln lösliche Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate sind für verschiedene Anwendungsfälle von Interesse, vor allem in der Biotechnologie und angewandten, medizinischen Forschung. Das setzt in jedem Falle auch die Funktionalisierung dieser Polymeren, am besten durch kovalente Verknüpfung, mit biologisch aktiven Verbindungen voraus. Diese kovalente Bindung von biologisch aktiven Verbindungen erfordert aber, daß zunächst einmal reaktive Derivate der genannten Polymeren vorliegen, die zu diesen Verknüpfungsreaktionen befähigt sind. Die bisher beschriebenen Methoden zur Aktivierung und Funktionalisierung mit biologisch aktiven Verbindungen der hydroxylgruppenhaltigen Polyoxyalkylenglykole und der Monoalkoxyderivate dieser Polymeren (Life Sci., 1983, 33, 1467–1473) reichen für eine breite Anwendung aber mit Sicherheit nicht aus. Mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Derivate der Polyoxyalkylenglykole und ihre gleichartig substituierten Monoalkoxyderivate stellen ebenso geeignete Derivate dieser Polymeren dar, um biologisch aktive Verbindungen an sie kovalent zu binden, zumal mit diesen reaktiven Gruppen substituierte Polymere der genannten Art aus den hydroxylgruppenhaltigen Ausgangspolymeren durch in der Regel einfache chemische Reaktionen synthetisiert werden können.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, biologisch aktive Verbindungen an mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate nach Aktivierung der genannten, funktionellen Gruppen kovalent zu binden. Dadurch sollen modifizierte, biologisch aktive Verbindungen mit breiten Anwendungsmöglichkeiten erhalten werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen und Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole oder ihre ebenso substituierten Monoalkoxyderivate in eine aktivierte Form zu überführen und an diese aktivierten Polymeren biologisch aktive Verbindungen kovalent zu binden. Erfindungsgemäß wird das dadurch erreicht, daß primäre Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen enthaltende Polymere, abgeleitet vom Typ der Polyoxyalkylenglykole oder ihrer Monoalkoxyderivate, in wäßrigen Lösungen im pH-Bereich von 2,0 bis 12,0 oder organischen Lösungsmitteln beziehungsweise Gemischen organischer Lösungsmittel oder Gemischen von wäßrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln bei Reaktionstemperaturen im Bereich von 0°C bis 150°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 8 Stunden, gegebenenfalls in Gegenwart einer Puffersubstanz oder eines säurebindenden Mittels, mit bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmitteln umgesetzt und aktiviert werden und an die aktivierten Polymeren in wäßrigen Lösungen, die gegebenenfalls

gepuffert sind oder Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln oder in organischen Lösungsmitteln oder in Gemischen organischer Lösungsmittel, in letzteren beiden Fällen gegebenenfalls in Gegenwart säurebindender Mittel, im Verlaufe von 30 Minuten bis 12 Stunden bei Temperaturen von 0°C bis 150°C biologisch aktive Verbindungen kovalent gebunden werden. Als biologisch aktive Verbindungen für die erfindungsgemäße, kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden nieder- und hochmolekulare Verbindungen eingesetzt. Neben ihrer biologischen Wirksamkeit ist für eine erfolgreiche und stabile Bindung an die genannten Polymeren das Vorliegen reaktiver, funktioneller Gruppen zusätzliche Voraussetzung. Erfindungsgemäß werden biokatalytisch aktive Verbindungen wie Enzyme – bevorzugt solche aus den Klassen der Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen und Isomerasen-Mikroorganismen, tierische, pflanzliche und humane Zellen, Zellorganellen, synthetische Enzyme oder Koenzyme, aber auch biokatalytisch inaktive Proteine wie Antigene, Antikörper, Wachstumsfaktoren, Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Hemoproteine, Albumine und zuckerbindende Proteine wie die Lektine kovalent gebunden. Andere biologisch aktive Verbindungen, die den zuvor genannten Kategorien nicht zugeordnet werden können und die für eine kovalente Bindung an Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate in Frage kommen, sind zum Beispiel Nukleinsäuren, Bruchstücke der Nukleinsäuren, Koenzyme, Peptide, Haptene, Hormone, Vitamine, Pharmaka sowie Sauerstoff bindende, transportierende und aktivierende, synthetische Verbindungen.

Als bi- oder multifunktionelle Aktivierungsmittel für mit primären Aminogruppen, Thiolgruppen, Amidoximgruppen, Hydroxamsäuregruppen oder Karbonsäurehydrazidgruppen substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate werden Dialdehyde, aromatische, diazotierte Diamine, Disocyanate, Diisothiocyanate, Säureazide, und aktivierte Ester von Dikarbonsäuren, Diepoxide, Chinone, Karbodilimide, Epihalogenhydrine, 2,4,6-Trihalogen-1,3,5-triazine, oder 2-substituierte, 4,6-Dihalogen-1,3,5-triazine verwendet, wobei die Auswahl der bi- oder multifunktionellen Aktivierungsmittel auch durch die Reaktivität der substituierten Polymeren bestimmt wird. Die Aktivierungsreaktionen werden vorzugsweise in organischen Lösungsmitteln ausgeführt und dann bei Reaktionstemperaturen von 20°C bis 80°C im Verlaufe von 30 Minuten bis 6 Stunden. Da bei einer Reihe von Reaktionen Säuren freigesetzt werden, wird in diesen Fällen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels gearbeitet, zum Beispiel einem tertiärem Amin, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxiden, Alkalikarbonaten, Alkalialkoholaten oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten. Die ebenfalls möglichen Aktivierungsreaktionen mit einer Reihe bi- oder multifunktioneller Aktivierungsmittel in wäßrigen Lösungen werden bei säurefreisetzenden Reaktionen vorzugsweise in Gegenwart von Puffersubstanzen durchgeführt.

Die Reaktionen zur kovalenten Bindung der biologisch aktiven Verbindungen an die aktivierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate können in Abhängigkeit von der zu bindenden Komponente unter unterschiedlichsten Reaktionsbedingungen ausgeführt werden. Eine bevorzugte Variante, vor allem für Proteine, besteht darin, daß die biologisch aktiven Verbindungen in Pufferlösungen mit pH-Werten von 2,0 bis 12,0 bei 0°C bis 60°C im Verlaufe von 1 Stunde bis 12 Stunden an die Polymeren kovalent gebunden werden. Eine andere bevorzugte Variante besteht darin, daß die kovalente Bindung der biologisch aktiven Verbindungen in wäßrigen Lösungen, Gemischen dieser mit organischen Lösungsmitteln, organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden erfolgt. Eine weitere erfindungsgemäße Variante ist dadurch gekennzeichnet, daß Biokatalysatoren und hierbei vorzugsweise Enzyme, in organischen Lösungsmitteln oder Gemischen organischer Lösungsmittel bei 0°C bis 100°C, bei Säuren freisetzenden Reaktionen in Gegenwart eines säurebindenden Mittels, im Verlaufe von 1 Stunde bis 10 Stunden kovalent an die substituierten Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate gebunden werden. Bei den Umsetzungen in organischen Lösungsmitteln gegebenenfalls freigesetzte Säuren werden durch säurebindende Mittel wie tertiäre Amine, Heterocyclen mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, Alkalihydroxide, Alkalikarbonate, Alkalialkoholate, oder Alkalisalzen kondensierter Aromaten und Heteroaromaten gebunden und neutralisiert.

Für die Isolierung und gegebenenfalls erforderliche Reinigung der an substituierte Polyoxyalkylenglykole und ihre Monoalkoxyderivate kovalent gebundenen, biologisch aktiven Verbindungen stehen eine Vielzahl bekannter Methoden zur Verfügung. Die mit Biokatalysatoren oder mit biokatalytisch inaktiven Proteinen modifizierten Polymeren werden in der Regel aus den wäßrigen Reaktionslösungen nach Methoden der Proteingewinnung und Proteinreinigung zum Beispiel durch Dialyse, Ultrafiltration und Gefriertrocknung oder durch Fällungsreaktionen mit anorganischen Salzen und organischen Lösungsmitteln isoliert. Die dabei gewonnenen Produkte können durch chromatographische Methoden wie die Gel-, Ionenaustauscher oder Affinitätschromatographie weiter gereinigt werden. In organischen Lösungsmitteln lösliche Reaktionsprodukte der Umsetzungsreaktionen, besonders die Kopplungsprodukte von niedermolekularen, biologisch aktiven Verbindungen mit den substituierten Polyoxyalkylenglykolen und ihren Monoalkoxyderivaten, werden aus den Reaktionslösungen durch Verdampfen der organischen Lösungsmittel, gegebenenfalls im Vakuum oder durch Fällungsreaktionen mit anderen organischen Lösungsmitteln oder nach Versetzen der Reaktionslösungen mit Wasser durch Extraktion mit in Wasser nicht löslichen oder mischbaren, organischen Lösungsmitteln und Ausfällen aus diesen Lösungsmitteln isoliert. Auch diese Reaktionsprodukte können weiter gereinigt werden, zum Beispiel durch Umfällen, Umkristallisieren oder mit Methoden der Chromatographie. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen in einfacher Weise an Polymere vom Typ der Polyoxyalkylenglykole und ihrer Monoalkoxyderivate kovalent gebunden werden. Durch die kovalente Bindung entstehen neue und stabile Derivate biologisch aktiver Verbindungen. Sie besitzen für die praktische Anwendung vorteilhafte Eigenschaften, da sie in der Regel sowohl in wäßrigen Lösungen als auch in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Dadurch ergeben sich breite und verbesserte Anwendungsfelder dieser modifizierten Polymeren in der Biotechnologie, Biochemie, Pharmazie und Medizin. Die Erfindung wird anhand von Beispielen weiter erläutert.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

1 g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) in der Form seines Natriumsalzes werden in 7 ml destilliertem Wasser gelöst, und zu der Lösung werden 10 ml Aceton zugegeben. Die Lösung wird auf 5°C bis 10°C abgekühlt und tropfenweise mit einer acetonischen Lösung von 0,8 g Cyanurchlorid in 5 ml Aceton versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach mit 25 ml destilliertem Wasser versetzt und anschließend dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform extrahiert. Das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 50 mg in 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöste Penicillinacylase addiert. Nach dem Filtrieren wird die Lösung 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeengt und lyophilisiert.

Beispiel 2

1 g w,w'-Diamino-polyethylenglykol (MG 6000) werden in 10 ml 0,05 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 gelöst. Zu der Lösung werden 0,3 ml 25%iger Glutaraldehyd addiert. Die Lösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, und danach werden 10 mg Cholesterinesterase in lyophilisierter Form zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 5 Stunden bei 4°C gerührt und anschließend gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die resultierende Lösung wird durch Ultrafiltration auf 2 ml eingeengt und lyophilisiert.

Beispiel 3

Entsprechend Beispiel 2 wird das Enzym β -Lactamase kovalent gebunden, mit der Ausnahme, daß ein 0,1 molarer Phosphatpuffer vom pH-Wert 8,4 verwendet wird und das dialysierte und eingeengte Reaktionsgemisch zur Isolierung und Reinigung des modifizierten Enzyms auf eine mit einem Affinitätssträger gefüllte Chromatographiesäule aufgetragen und chromatographiert wird.

Beispiel 4

Entsprechend Beispiel 2 werden die Enzyme Cholesterinoxidase und Lipase (aus *Rhizopus arrhizus*) modifiziert, mit der Ausnahme, daß w-Methoxy-w'-amino-polyethylenglykol verwendet werden.

Beispiel 5

1 g des Bishydroxamsäurederivates des Polyethylenglykols (MG 6000) wird in 10 ml 0,05 normaler Natronlauge gelöst, mit 1 ml Epichlorhydrin versetzt, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das aktivierte Derivat des Polyethylenglykols dreimal mit jeweils 15 ml Chloroform aus der wäßrigen Lösung extrahiert, das Chloroform wird verdampft, und zum festen Rückstand werden 10 mg Concanavalin A addiert, das in 10 ml 0,1 molarem Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 aufgelöst war. Die Lösung wird 9 Stunden bei 30°C gerührt und danach gegen ein Calciumsalz und Zinksalz enthaltendes, destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung wird danach auf 2 ml eingeengt, und das modifizierte Concanavalin A wird durch Fällung mit Ammoniumsulfat isoliert.

Beispiel 6

Es wird ein Reaktionsgemisch aus 1 g des Bisamidoxyderivates des Polyethylenglykols (MG 6000) mit 1 ml 25%igem Glutaraldehyd und 0,1 ml einer Suspension vom Mikroorganismus *Bacillus subtilis* in 20 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,0 hergestellt, und die resultierende Suspension wird 5 Stunden bei 4°C gerührt. Die Suspension wird danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, und der Feststoff wird durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt. Zur Isolierung des Feststoffes ohne Dialyse wird dieser mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und zentrifugiert.

Beispiel 7

1 g w-Methoxy-w'-hydroxamsäure-polyethylenglykol (MG 5000) werden in 20 ml Chloroform gelöst und 0,4 ml Toluendiisocyanat, aufgelöst in 5 ml trockenem Aceton, werden zur Chloroformlösung addiert. Die Reaktionslösung wird 1 Stunde bei Umgebungstemperatur gerührt, danach auf etwa 5 ml eingeengt und schließlich mit 50 ml trockenem Ether versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird gesammelt, getrocknet und in dieser Form zu einer Enzymlösung bei 4°C addiert, die hergestellt wurde durch Auflösen von Cholinesterase oder Cholinesterase in destilliertem Wasser. Die resultierende Lösung wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 1 Stunde bei dieser Temperatur gerührt. Danach wird gegen destilliertes Wasser dialysiert, die Lösung auf etwa 2 ml eingeengt und lyophilisiert. Der Rückstand wird durch Gelchromatographie mit Sephadex G50 weiter aufgetrennt, um die modifizierten Enzyme in reiner Form zu erhalten.

Beispiel 8

1 g Polyethylenglykol-w,w'-dikarbonsäure-dihydrazid (MG 6000) wird gemeinsam mit 0,5 g Benzochinon in einem Lösungsmittelgemisch aus 15 ml Chloroform und 10 ml Aceton gelöst. Es werden 0,2 g Kaliumcarbonat zur Lösung addiert, und das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird ein fester Rückstand abfiltriert, und die Lösung wird auf 5 ml eingeengt und mit 50 ml Petrolether versetzt. Der Niederschlag wird abgetrennt, getrocknet und zu 20 ml eines 0,1 molaren Boratpuffers vom pH-Wert 8,0, in dem 20 mg Rinderserum-Albumin aufgelöst waren, addiert. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, auf etwa 2 ml eingeengt und schließlich lyophilisiert.

Beispiel 9

1 g w-Methoxy-w'-mercapto-polyethylenglykol (MG 5000) werden in 25 ml Benzen gelöst, und 0,8 g 2-Methoxy-4,6-dichlor-1,3,5-triazin und 0,5 ml Triethylamin werden zur Lösung addiert. Das Reaktionsgemisch wird 4 Stunden bei 80°C gerührt und nach dem Abkühlen dreimal mit jeweils 20 ml destilliertem Wasser ausgeschüttelt. Die Benzenschicht wird zur Trockne eingedampft, und zum Rückstand werden 10 ml 0,5 molarer Boratpuffer vom pH-Wert 10,0 addiert, in dem 20 mg Hämoglobin vom Rind aufgelöst waren. Die Lösung wird 8 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt, danach gegen destilliertes Wasser dialysiert, eingeengt, und der Rückstand wird chromatographisch mit Hilfe einer mit Sephadex G50 gefüllten Säule aufgetrennt. Das erste Säuleneluat enthält das modifizierte Hämoglobin.

Beispiel 10

1 g Imidazol, 1 g w,w'-Dimercapto-polyethylenglykol (MG 6000) und 0,6 g Cyanurchlorid werden in 50 ml trockenem Benzen gelöst, und die Lösung wird 3 Stunden bei Umgebungstemperatur gerührt. Die Lösung wird filtriert, mit 20 mg Lipase aus *Rhizopus arrhizus* versetzt, und die Suspension wird 3 Stunden bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen wird filtriert und das Benzen im Vakuum bei Normaltemperatur entfernt. Der Rückstand wird in destilliertem Wasser aufgenommen und über eine Sephadex G50-Säule chromatographiert. Ein blokatalytisch aktives, modifiziertes Lipasepräparat wird als erste Fraktion von der Säule eluiert.

Beispiel 11

1 g w'-Amidoximderivat des w-Methoxy-polyethylenglykols (MG 5000) werden zu 15 ml frisch destilliertem Dimethylformamid addiert, in dem 0,3 g Hemin und 1,5 g Imidazol aufgelöst waren. Nachdem alle Komponenten aufgelöst waren, wird die Lösung auf eine Temperatur von 0°C bis 4°C gebracht, und zur Lösung wird eine Lösung diazotierten Benzidins addiert. Das Reaktionsgemisch wird auf Umgebungstemperatur gebracht und 2 Stunden gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch in 75 ml destilliertes Wasser eingetragen, und dreimal wird mit jeweils 20 ml Benzen extrahiert. Die Benzenlösung wird mit Natriumsulfat getrocknet, auf 5 bis 10 ml eingeengt und mit 75 ml Petroläther versetzt. Der Niederschlag des mit w-Methoxy-polyethylenglykol modifizierten Komplexes aus Hemin und Imidazol wird gesammelt und bei Umgebungstemperatur getrocknet.

Translator's Report/Comments

Your ref: DD 00287950

Your order of (date):

In translating the above text we have noted the following apparent errors/unclear passages which we have corrected or amended:

Page/para/line*	Comment
2/3/3	"die" assumed to mean "sie"
Claims: Cl. 3/2	"Diisobiocyanate" should possibly be "Diisothiocyanate" The former has been kept in the translation.

* This identification refers to the source text. Please note that the first paragraph is taken to be, where relevant, the end portion of a paragraph starting on the preceding page. Where the paragraph is stated, the line number relates to the particular paragraph. Where no paragraph is stated, the line number refers to the page margin line number.

TRC1 1.7.92

Translator's Report/Comments

Your ref:

Your order of (date):

In translating the above text we have noted the following apparent errors/unclear passages which we have corrected or amended:

Page/para/line*	Comment

* This identification refers to the source text. Please note that the first paragraph is taken to be, where relevant, the end portion of a paragraph starting on the preceding page. Where the paragraph is stated, the line number relates to the particular paragraph. Where no paragraph is stated, the line number refers to the page margin line number.

For information purposes only

Method for covalently bonding biologically active compounds to substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives

Area of application of the invention

The invention relates to a method for covalently bonding biologically active compounds to substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives. The method, and the compounds which are prepared by this method, can be used in biotechnology, biochemistry, pharmacy and medicine.

Characterization of the prior art

Macromolecular compounds possessing amino groups are very frequently used, and those possessing thiol, amidoxime, hydroxamic acid or carboxylic hydrazide groups are less frequently used, for immobilizing biologically active compounds (Methods Enzymol. 1988, 137, [Immobilized Enzymes and Cells], Pts. A-D, Ed. by K. Mosbach). However, in this form, the macromolecules which are provided with said functional groups can only be used in immobilization reactions when reactive, biologically active compounds which possess highly activated groups are to be bonded covalently to the macromolecules. However, in connection with immobilization reactions, the macromolecular compounds

possessing said functional groups are as a rule activated prior to the covalent bonding of the biologically active compounds, which in practice means that the functional groups of the macromolecules have to be converted into a reactive stage which is such that a dilution reaction of the two components can take place.

In compounds which contain amino, thiol, amidoxime, carboxylic hydrazide and hydroxamic acid groups, in the latter compounds the oxime group $=\text{NOH}$ can also be present as a tautomeric form, the functional groups possess nucleophilic properties, which means that they are accessible to nucleophilic substitution reactions and also a very wide variety of addition reactions. These reaction types belong to the fundamental reactions of synthetic chemistry and novel compounds can be synthesized in this way by means of a large number of reactions which link two or more known compounds. These reaction principles are also used for activating the insoluble macromolecules, such as cellulose, sepharoses, sephadexes and polyhydroxyethyl methacrylates which are suitable for immobilizing biologically active compounds. Bifunctional or multifunctional low molecular weight activating agents are very frequently used with advantage in these cases because, in this way, the macromolecule is already present in activated form after one reaction step. The activating agents which are bifunctional or multifunctional and which are suitable for activating

macromolecules include a large number of readily available chemical reagents which are suitable for an activation. Examples of some important activating agents are dialdehydes, activated dicarboxylic acid derivatives, aliphatic dihalides and aromatic and heteroaromatic dihalides which have been made reactive by activation and/or more highly halogenated compounds and functionalized diamino compounds which have at the same time been made reactive.

Polymers of the polyoxyalkylene glycol type, and their monoalkoxy derivatives, which are soluble in aqueous solutions and organic solvents are of interest for a variety of applications, principally in biotechnology and applied medical research. In every case, this also requires the functionalization of these polymers, optimally by means of covalent linkage, with biologically active compounds. However, this covalent bonding of biologically active compounds first of all requires the availability of reactive derivatives of said polymers which are capable of undergoing these linking reactions. The previously described methods for activating the hydroxyl group-containing polyoxyalkylene glycols and the monoalkoxy derivatives of these polymers, and functionalizing them with biologically active compounds (Life Sci., 1983, 33, 1467-1473) are certainly not adequate for any wide application. Derivatives of the polyoxyalkylene glycols which are substituted by primary amino groups, thiol groups, amidoxo groups, hydroxamic acid groups or carboxylic

hydrazide groups, and their monoalkoxy derivatives which are substituted in the same way, likewise constitute derivatives of these polymers which are suitable for biologically active compounds to be bonded to them covalently, especially since polymers of said type which are substituted by these reactive groups can be synthesized from the original, hydroxyl group-containing polymers by what are as a rule simple chemical reactions.

Aim of the invention

The aim of the invention is to bond biologically active compounds covalently to polymers of the polyoxyalkylene glycol type, and their monoalkoxy derivatives, which are substituted by primary amino groups, thiol groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups or carboxylic hydrazide groups after said functional groups have been activated. Modified, biologically active compounds having a wide range of possible applications are to be obtained as a result.

Explanation of the nature of the invention

The object of the invention is to convert polyoxyalkylene glycols which are substituted by primary amino groups, thiol groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups and carboxylic hydrazide groups, or their monoalkoxy derivatives which are substituted in the same way, into an

activated form and to covalently bond biologically active compounds to these activated polymers. According to the invention, this is achieved by reacting, and activating, polymers which contain primary amino groups, thiol groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups or carboxylic hydrazide groups, and which are derived from the polyoxyalkylene glycol type, or their monoalkoxy derivatives, in aqueous solutions in a pH range of from 2.0 to 12.0, or organic solvents, or, respectively, mixtures of organic solvents or mixtures of aqueous solutions and organic solvents, at reaction temperatures in a range of from 0°C to 150°C, in the course of from 30 minutes to 8 hours, if appropriate in the presence of a buffering substance or of an acid-binding agent, with bifunctional or multifunctional activating agents and covalently bonding, over the course of from 30 minutes to 12 hours and at temperatures of from 0°C to 150°C, biologically active compounds to the activated polymers in aqueous solutions, which are buffered if appropriate, or mixtures of these solutions with organic solvents, or in organic solvents or in mixtures of organic solvents, in the latter two cases in the presence of acid-binding agents, where appropriate. Low molecular weight and high molecular weight compounds are employed as biologically active compounds for the covalent bonding, according to the invention, to polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives. Aside from their biological activity, the

presence of reactive, functional groups is an additional requirement for successful and stable bonding to said polymers. According to the invention, biocatalytically active compounds such as enzymes, preferably those from the oxidoreductase, transferase, hydrolase and isomerase classes, microorganisms, animal, plant and human cells, cell organelles, synthetic enzymes or coenzymes, and also biocatalytically inactive proteins such as antigens, antibodies, growth factors, blood coagulation factors, interferons, hemoproteins, albumins and sugar-binding proteins such as the lectins, are covalently bonded. Examples of other biologically active compounds which cannot be assigned to the previously mentioned categories and which are suitable for covalent bonding to polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives are nucleic acids, nucleic acid fragments, coenzymes, peptides, haptens, hormones, vitamins, pharmaceuticals and synthetic compounds which bind, transport and activate oxygen.

Dialdehydes, aromatic, diazotized diamines, diisocyanates, diisothiocyanates, acid chlorides, acid azides, and activated esters of dicarboxylic acids, diepoxides, quinones, carbodiimides, epihalohydrins, 2,4,6-trihalo-1,3,5-triazines, or 2-substituted 4,6-dihalo-1,3,5-triazines are used as bifunctional or multifunctional activating agents for polyoxyalkylene glycols, and their monoalkoxy derivatives, which are substituted by primary

amino groups, thiol groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups or carboxylic hydrazide groups, with the choice of the bifunctional or multifunctional activating agents also being determined by the reactivity of the substituted polymers. The activation reactions are preferably carried out in organic solvents and then at reaction temperatures of from 20°C to 80°C in the course of from 30 minutes to 6 hours. Since acids are released in a number of reactions, the reactions in these cases are carried out in the presence of an acid-binding agent, for example a tertiary amine, heterocycles having an endocyclic, tertiary nitrogen atom, alkali metal hydroxides, alkali metal carbonates, alkali metal alkoxides or alkali metal salts of fused aromatic and heteroaromatic compounds. The activation reactions, which are likewise possible, using a number of bifunctional or multifunctional activating agents in aqueous solutions are preferably carried out in the presence of buffering substances in the case of acid-releasing reactions.

The reactions for covalently bonding the biologically active compounds to the activated polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives can be carried out under a very wide variety of reaction conditions depending on the component which is to be bonded. A preferred variant, especially for proteins, consists in the biologically active compounds being covalently bonded to the polymers, at from 0°C to 60°C and in the course of from 1 hour to 12 hours, in

buffer solutions having pH values of from 2.0 to 12.0. Another preferred variant is for the covalent bonding of the biologically active compounds to take place in aqueous solutions, mixtures of these solutions with organic solvents, organic solvents, or mixtures of organic solvents, at from 0°C to 100°C, in the presence of an acid-binding agent in the case of reactions which release acids, and in the course of from 1 hour to 10 hours. Another variant according to the invention is characterized by biocatalysts, and in this connection preferably enzymes, being covalently bonded to the substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives, at from 0°C to 100°C and during the course of from 1 hour to 10 hours, in organic solvents or mixtures of organic solvents, and in the presence of an acid-binding agent in the case of reactions which release acids. Acids which may possibly be released in the reactions in organic solvents are bound and neutralized by acid-binding agents such as tertiary amines, heterocycles having an endocyclic, tertiary nitrogen atom, alkali metal hydroxides, alkali metal carbonates, alkali metal alkoxides or alkali metal salts of fused aromatic and heteroaromatic compounds.

A large number of known methods are available for isolating and purifying, as may be necessary, the biologically active compounds which are covalently bonded to substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives. The polymers which are modified with

biocatalysts or with biocatalytically inactive proteins are as a rule isolated from the aqueous reaction solutions using methods of protein isolation and protein purification, for example by means of dialysis, ultrafiltration and freeze drying or by means of precipitation reactions using inorganic salts and organic solvents. The products which are obtained in this connection can be purified further by means of chromatographic methods such as gel chromatography, ion exchange chromatography or affinity chromatography. The reaction products of the conversion reactions which are soluble in organic solvents, particularly the products of the coupling of low molecular weight, biologically active compounds to the substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives, are isolated from the reaction solutions by means of evaporating the organic solvents, where appropriate in vacuo, or by means of precipitation reactions using other organic solvents or after treating the reaction solutions with water, by means of extracting with organic solvents which are not soluble or miscible in water and precipitating from the solvents. These reaction products can also be subjected to further purification, for example by means of reprecipitating or recrystallizing or using chromatographic methods. The method according to the invention can be used to covalently bond a large number of biologically active compounds to polymers of the polyoxyalkylene glycol type, and their monoalkoxy

derivatives, in a simple manner. The covalent bonding results in the formation of novel and stable derivatives of biologically active compounds. They possess properties which are advantageous for practical application since they are as a rule soluble both in aqueous solutions and in organic solvents. This results in these modified polymers having wide and improved areas of application in biotechnology, biochemistry, pharmacy and medicine. The invention is explained further with the aid of examples.

Exemplary embodiment

Example 1

1 g of w,w'-dimercaptopolyethylene glycol (MW 6000), in the form of its sodium salt, is dissolved in 7 ml of distilled water, and 10 ml of acetone are added dropwise to the solution. The solution is cooled down to from 5°C to 10°C and an acetonic solution of 0.8 g of cyanuric chloride in 5 ml of acetone is added dropwise. The reaction mixture is stirred at ambient temperature for 3 hours after which it is treated with 25 ml of distilled water and then extracted three times with in each case 15 ml of chloroform. The chloroform is evaporated and 50 mg of penicillin acylase, dissolved in 0.1 molar borate buffer, pH 10.0, are added to the solid residue. After filtering, the solution is stirred at ambient temperature for 8 hours. After that, the solution is dialyzed against distilled water, concentrated down to

2 ml by ultrafiltration and lyophilized.

Example 2

1 g of w,w'-diaminopolyethylene glycol (MW 6000) is dissolved in 10 ml of 0.05 molar phosphate buffer, pH 7.0. 0.3 ml of 25% glutaraldehyde is added to the solution. The solution is stirred at ambient temperature for 1 hour and, after that, 10 mg of cholesterol esterase in lyophilized form are added to the solution. The reaction mixture is stirred at 4°C for 5 hours and then dialyzed against distilled water. The resulting solution is concentrated down to 2 ml by ultrafiltration and lyophilized.

Example 3

The enzyme β -lactamase is covalently bonded in accordance with example 2 except that a 0.1 molar phosphate buffer, pH 6.4, is used and, for the purpose of isolating and purifying the modified enzyme, the dialyzed and concentrated reaction mixture is loaded onto an affinity support-filled chromatography column and chromatographed.

Example 4

The enzymes cholesterol oxidase and lipase (from *Rhizopus arrhizus*) are modified in accordance with example 2 except that w-methoxy-w'-aminopolyethylene glycol is used.

Example 5

1 g of the bishydroxamic acid derivative of polyethylene glycol (MW 6000) is dissolved in 10 ml of 0.05 normal sodium hydroxide solution after which 1 ml of epichlorohydrin is added and the reaction mixture is heated at 80°C for 3 hours. After cooling, the activated derivative of the polyethylene glycol is extracted three times from the aqueous solution with in each case 15 ml of chloroform, after which the chloroform is evaporated and 10 mg of concanavalin A, which was dissolved in 10 ml of 0.1 molar borate buffer, pH 10.0, are added to the solid residue. The solution is stirred at 30°C for 9 hours and, after that, dialyzed against distilled water containing a calcium salt and a zinc salt. The solution is then concentrated down to 2 ml and the modified concanavalin A is isolated by precipitating with ammonium sulfate.

Example 6

A reaction mixture consisting of 1 g of the bisamidoxime derivative of the polyethylene glycol (MW 6000), 1 ml of 25% glutaraldehyde and 0.1 ml of a suspension of the microorganism *Bacillus subtilis* in 20 ml of 0.1 molar phosphate buffer, pH 7.0, is prepared and the resulting suspension is stirred at 4°C for 5 hours. The suspension is then dialyzed against distilled water and the solid is separated off from the solution by centrifugation. In order

to isolate the solid without dialysis, it is washed several times with distilled water and centrifuged.

Example 7

1 g of w-methoxy-w'-hydroxamic acid polyethylene glycol (MW 5000) is dissolved in 20 ml of chloroform, and 0.4 ml of toluene diisocyanate, dissolved in 5 ml of dry acetone, is added to the chloroform solution. The reaction solution is stirred at ambient temperature for 1 hour, after which it is concentrated down to about 5 ml and finally treated with 50 ml of dry ether. The precipitate which has sedimented out is collected and dried and in this form added, at 4°C, to an enzyme solution which was prepared by dissolving choline oxidase or choline esterase in distilled water. The resulting solution is brought to ambient temperature and stirred at this temperature for 1 hour. The solution is then dialyzed against distilled water, after which it is concentrated down to about 2 ml and lyophilized. The residue is fractionated by gel chromatography using Sephadex G50 in order to obtain the modified enzymes in pure form.

Example 8

1 g of polyethylene glycol-w,w'-dicarboxylic dihydrazide (MW 6000) is dissolved, together with 0.5 g of benzoquinone, in a solvent mixture composed of 15 ml of

chloroform and 10 ml of acetone. 0.2 g of potassium carbonate is added to the solution and the reaction mixture is stirred at 50°C for 3 hours. After cooling, a solid residue is filtered off and the solution is concentrated down to 5 ml and treated with 50 ml of petroleum ether. The precipitate is separated off, dried and added to 20 ml of a 0.1 molar borate buffer, pH 8.0, in which 20 mg of bovine serum albumin are dissolved. The solution is stirred at ambient temperature for 8 hours, after which it is dialyzed against distilled water; it is then concentrated down to about 2 ml and finally lyophilized.

Example 9

1 g of w-methoxy-w'-mercaptopolyethylene glycol (MW 5000) is dissolved in 25 ml of benzene, and 0.8 g of 2-methoxy-4,6-dichloro-1,3,5-triazine and 0.5 ml of triethylamine are added to the solution. The reaction mixture is stirred at 80°C for 4 hours and, after cooling, is extracted three times by shaking with in each case 20 ml of distilled water. The benzene layer is evaporated to dryness and 10 ml of 0.5 molar borate buffer, pH 10.0, in which 20 mg of bovine hemoglobin were dissolved, are added to the residue. The solution is stirred at ambient temperature for 8 hours after which it is dialyzed against distilled water and concentrated; the residue is then fractionated chromatographically using a Sephadex G50-filled column. The

first column eluate contains the modified hemoglobin.

Example 10

1 g of imidazole, 1 g of w,w'-dimercaptopolyethylene glycol (MW 6000) and 0.6 g of cyanuric chloride are dissolved in 50 ml of dry benzene and the solution is stirred at ambient temperature for 3 hours. The solution is filtered after which 20 mg of *Rhizopus arrhizus* lipase are added to it and the resulting suspension is stirred at 60°C for 3 hours. After cooling, the mixture is filtered and the benzene is removed in vacuo and at normal temperature. The residue is taken up in distilled water and this solution is chromatographed through a Sephadex G50 column. A biocatalytically active, modified lipase preparation is eluted from the column as the first fraction.

Example 11

1 g of w'-amidoxime derivative of the w-methoxypolyethylene glycol (MW 5000) is added to 15 ml of freshly distilled dimethylformamide in which 0.3 g of hemin and 1.5 g of imidazole have been dissolved. After all the components have dissolved, the solution is brought to a temperature of from 0°C to 4°C and a solution of diazotized benzidine is added to the solution. The reaction mixture is brought to ambient temperature and stirred for 2 hours. After that, the reaction mixture is introduced into 75 ml of

distilled water and this mixture is extracted three times with in each case 20 ml of benzene. The benzene solution is dried with sodium sulfate and then concentrated down to from 5 to 10 ml after which 75 ml of petroleum ether are added. The precipitate of the w-methoxypolyethylene glycol-modified complex composed of Hemin and imidazole is collected and dried at ambient temperature.

Patent claims:

1. A method for covalently bonding biologically active compounds to substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives, wherein biologically active compounds are covalently bonded, in aqueous solutions, which are buffered where appropriate, or in organic solvents, where appropriate in the presence of acid-binding agents, or mixtures of aqueous solutions and organic solvents which are buffered where appropriate or treated with acid-binding agents, or mixtures of organic solvents, where appropriate likewise in the presence of acid-binding agents, in the course of from 30 minutes to 12 hours and at temperatures of from 0°C to 150°C, to polymers which are derived from the polyoxyalkylene glycol polymer type, or their monoalkoxy derivatives, which contain thiol groups, primary amino groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups or carboxylic hydrazide groups and which are activated, in aqueous solutions in a pH range of from 2 to 12 or organic solvents or, respectively, solvent mixtures composed of organic solvents or mixtures of aqueous solutions and organic solvents, at reaction temperatures in the range of from 0°C to 150°C and in the course of from 30 minutes to 8 hours, where appropriate in the presence of an acid-binding agent or a buffering substance, with bifunctional or multifunctional activating agents, and the products are isolated and purified using methods which are known per se.

2. The method as claimed in claim 1, wherein the biologically active compounds employed are biocatalysts such as enzymes, microorganisms, animal, plant and human cells, cell organelles, synthetic enzymes and coenzymes or biocatalytically inactive proteins such as antigens, antibodies, growth factors, blood coagulation factors, interferons, hemoproteins, albumins, sugar-binding proteins or in-vitro-prepared conjugates composed of biocatalysts and biocatalytically inactive proteins or low molecular weight and high molecular weight effectors such as nucleic acids, nucleic acid fragments, coenzymes, peptides, haptens, hormones, vitamins, pharmaceuticals, synthetic compounds which bind, activate and transport oxygen, and also affinity ligands.

3. The method as claimed in claim 1, wherein the bifunctional or multifunctional activating agents employed are dialdehydes, diazotized, aromatic diamines, diisocyanates, diisobiocyanates, compounds which simultaneously contain diisocyanate and diisothiocyanate groups, bisactivated derivatives of dicarboxylic acids such as acid chlorides, acid azides and activated esters, diepoxides, quinones, epihalohydrins, carbodiimides, 2,4,6-trihalo-1,3,5-triazines or 2-substituted, 4,6-dihalo-1,3,5-triazines.

4. The method as claimed in claims 1 and 3, wherein the activating reactions are carried out in organic solvents or

mixtures of organic solvents, in the course of from 30 minutes to 6 hours and at reaction temperatures of from 20°C to 80°C, and in the presence of an acid-binding agent in the case of activating reactions which release acids.

5. The method as claimed in claims 1 to 4, wherein the covalent bonding of the biologically active compounds is effected in buffer solutions having pH values of from 2.0 to 12.0, at from 0°C to 60°C, and in the course of from 1 hour to 12 hours.

6. The method as claimed in claims 1 to 4, wherein the covalent bonding of the biologically active compounds is effected in aqueous solutions, mixtures of these solutions with organic solvents, organic solvents or mixtures of organic solvents, at from 0°C to 100°C, in the presence of a buffering substance or an acid-binding agent in the case of reactions which release acids, and during the course of from 1 hour to 10 hours.

7. The method as claimed in claims 1 to 4 and 6, wherein the covalent bonding of biocatalysts, preferably of enzymes, is effected in organic solvents or mixtures of organic solvents, in the presence of an acid-binding agent in the case of reactions which release acids, at from 0°C to 100°C and in the course of from 1 hour to 10 hours.

8. The method as claimed in claims 1 to 3, 4, 6 and 7, wherein the acid-binding agents employed are tertiary amines, heterocycles having an endocyclic, tertiary nitrogen atom,

alkali metal hydroxides, alkali metal carbonates, alkali metal alkoxides or alkali metal salts of fused aromatic and heteroaromatic compounds.

9. The method as claimed in claims 1 to 8, wherein the biocatalysts employed are enzymes belonging to the oxidoreductase, transferase, hydrolase or isomerase class.

Abstract

(57) The invention relates to a method for covalently bonding biologically active compounds to substituted polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives. Polyoxyalkylene glycols and their monoalkoxy derivatives having functional groups which contain primary amino groups, thiol groups, amidoxime groups, hydroxamic acid groups and carboxylic hydrazide groups are converted, using bifunctional or multifunctional activating agents, into activated polymers in a first reaction step. Biologically active compounds, for example biocatalytically active or inactive proteins and more highly integrated systems such as microorganisms, are covalently bonded to the activated polymers in a second reaction step. The reactions are effected in aqueous solutions, organic solvents or mixtures of the two, where appropriate in the presence of an acid-binding agent. The modified, biologically active compounds are employed in biotechnology and medicine.